Aus der Frauenklinik der Universität Bern

Direktor: Prof. Dr. W. Neuweiler

DER EINFLUSS VON MILCHSAEUREDEHYDROGENASE AUF MALIGNES TUMORGEWEBE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Universität Bern

vorgelegt von

Georg Lakatos

von Boston, Mass., USA

ARNAUD DRUCK BERN 1956

Aus der Frauenklinik der Universität Bern

Direktor: Prof. Dr. W. Neuweiler

DER EINFLUSS VON MILCHSAEUREDEHYDROGENASE AUF MALIGNES TUMORGEWEBE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Universität Bern

vorgelegt von

Georg Lakatos

von Boston, Mass., USA

ARNAUD DRUCK BERN 1956

Von der Medizinischen Fakultät auf Antrag des Herrn Prof. Dr. W. Neuweiler zum Druck als Dissertation genehmigt.

Bern, den 8. Dezember 1956.

Der Dekan der Medizinischen Fakultät:

Prof. Dr. W. Wilbrandt

EINLEITUNG

1. EINIGE PHYSIO-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER TUMORZELLEN

Allgemein ist nach Warburg (1, 2) bekannt, dass die Tumorzelle eine grosse glykolytische Kraft besitzt, das heisst, dass die glykolytische Spaltung nach Einbringen von Sauerstoff fortgesetzt wird. Das bösartige Tumorgewebe spaltet aus Zucker mindestens 70 mal soviel Milchsäure als die geprüften normalen Gewebe. Es zersetzt in 13 Stunden ebensoviel Zucker wie sein eigenes Trockengewicht beträgt. Die Zuckerspaltung verhält sich zur Zuckeroxydation wie 12 : 1 das heisst, von 13 angegriffenen Zuckermolekülen wird nur eins oxydiert, der Rest gespalten. Zwischen bösartigen und gutartigen Tumoren besteht hinsichtlich der Glykolyse kein prinzipieller, sondern nur ein gradueller Unterschied. Dies ist eine Erfahrung, die auch die Pathologie hinsichtlich des morphologischen Baues der Zellen gutartiger und bösartiger Tumoren bestätigen kann.

Warburg, Wund und Negelein (3) zeigten, dass die Milchsäurebildung auch im Tumor des lebenden Tieres stark erhöht ist. Die Säure wurde nach Eröffnung des Abdomens durch Anbohren des Tumors gewonnen. Es handelte sich um ein "Jensen Sarkom".

Harrison und Mellanby (4) zeigten, dass in vivo der Abbau von Glykogen zu Milchsäure durch mittlere Monoiodessigsäuredosen nicht aufgehalten werden kann. Dagegen kann man in vitro den Abbau von Glykogen zur Milchsäure mit Monoiodessigsäure zum Stillstand bringen.

Weiterhin kann nach Reynolds, Lemon, Walker und Wotiz (5) angenommen werden, dass die Permeabilität der karzinomatösen Zellmembran erhöht ist, sodass auch daraus auf erhebliche Aenderungen der Stoffwechselvorgänge innerhalb der Zelle geschlossen werden kann. Der hormonelle Einfluss auf diese Vorgänge geht aus der neuerdings gemachten Feststellung hervor, dass das Hauptmerkmal der hormonellen Wachstums- und Stoffwechselsteuerungen die Regulierung der Aktivität der Zellmembran darstellt. Dieselben Autoren behaupten im weiteren: Von den wenigen quantitativen Unterschieden, die zwischen karzinomatösen und gesunden Gewebszellen festgestellt werden konnten und die vielleicht eine Erklärung dafür bieten können, warum die Tumorzelle den normalen Wirtszellen in der Ausnutzung der zur Verfügung stehenden Nahrungs- und Aufbausubstanzen so überlegen ist, beziehen sich die wesentlichsten auf eine Vermehrung einiger Stoffwechselfermente im Zytoplasma der Tumorzelle. Endlich ist bekannt, dass das Wachstum eines malignen Tumors im Herzgewebe nur selten vorkommt.

2. EINIGE PHYSIO-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DES HERZMUSKELS

Das Herz besitzt die Fähigkeit, Zucker aus dem Blute zu entnehmen. Es wurde jedoch bewiesen, dass unter normalen Umständen diese Menge Zucker dem Herzen nicht genügend Energie liefern kann (6). Das Herz ist aber imstande, im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur, Milchsäure vom Blute zu beziehen (7). Es verwertet auch die Brenztraubensäure des Blutes (8). Die Mengen Glukose und Laktat werden vom Herzen reziprok verwertet, doch verbraucht das gewöhnliche Hundeherz umgefähr 3 mal mehr Laktat als Glukose (7). Die Milchsäure, welche das Herz vom Blute bezieht, entsteht von Blutglukose durch Glykolyse. Das Herz wird ohne Blutlaktat schnell kraftlos, erholt sich jedoch wieder schnell nach einer Laktatzugabe, da das Laktat wichtiger für die Kraft des Herzens ist als die Glukose (9). Das Glykogen des Herzmuskels entsteht von der Blutglukose und nicht vom Laktat (9).

Wenn ein quergestreifter Muskel mit Monoiodessigsäure vergiftet wird, hört der Abbau von Glykogen zu Milchsäure auf. Das Herz dagegen, wenn mit Monoiodessigsäure vergiftet, kann mit Sauerstoff eine unbestimmte Zeit lang weiterschlagen (10). Der Verbrauch von Laktat bleibt derselbe und der Phosphatgehalt ist nicht herabgesetzt. Ohne Sauerstoff kommt aber das Herz sehr bald zum Stillstand (11). Mit anderen Worten wird die Energie für eine sofortige Kontraktion durch den Abbau von ATP und Phosphat gegeben. Die Energie für den Aufbau dieser Substanzen ist gewöhnlich durch die Oxydation der Brenztraubensäure oder der Milchsäure gegeben. Ohne Sauerstoff wird aber Glykogen, wie im quergestreiften Muskel, zu Milchsäure abgebaut, und das wird nun die notwendige Energie für den Herzstoffwechsel. Wenn nun das Herz mit Monoiodessigsäure vergiftet wird, hört der Abbau von Glykogen zu Milchsäure auf; daher kommt es jetzt ohne Sauerstoff zum Herzstillstand. Es scheint, dass die Oxydation von Brenztraubensäure und Milchsäure sehr wichtig für den Stoffwechsel des Herzens ist. Das Blutlaktat wird als erstes im Herz verbrannt. Wenn das Blutlaktat fehlt, benutzt das Herz sein eigenes Glykogen. Dies wird so lange gebraucht, bis das Herz zum Stillstand kommt. Diese Theorie, welche die Oxydation der Milchsäure zum Mittelpunkt des Herzstoffwechsels macht, erklärt, warum das Laktat nicht zu Glykogen wird, dass aber der Ueberschuss des Laktats einen Glykogenverlust verhindert. Der Herzmuskel hat weiterhin kein Sarkolemm. Dadurch wird die Diffusion des Laktats sehr erleichtert. Dieser - leichtert es dem Herzmuskel schwere Arbeit auszuführen.

ZUSAMMENFASSUNG DER EINLEITUNG UND EIGENE UEBERLEGUNGEN

1. Die maligne Tumorzelle hat die Fähigkeit mehr Milchsäure zu produzieren als die benigne Tumorzelle, diese wieder mehr als die normale Zelle.

2. Die Tumorzelle kann bei Gegenwart von Sauerstoff die glykolytische Spaltung fortsetzen.

3. Bei der aeroben Glykolyse bildet die Tumorzelle Laktat und CO_2 im Verhältnis von 12:1.

4. Die Glykolyse von Tumorzellen wird durch mittlere Dosen von Monoiodessigsäure nicht beeinflusst.

5. Die maligne Tumorzelle ist mehr permeabel als die normale Zelle.

Wie man in der obigen Zusammenfassung sehen kann, scheint eine gewisse Aehnlichkeit zwischen dem Stoffwechsel des Herzens und der Tumorzelle zu bestehen. Die Tumorzelle besitzt bedeutend mehr Energie als die normale Zelle, da sie durch das infiltrative Wachstum ausgezeichnet ist. Doch oxydiert die Tumorzelle nur ein Zuckermolekül von 13, es werden also grosse Mengen von Zucker zu Milchsäure abgebaut. Da es aber bekannt ist, dass der oxydative Abbau des Zuckermoleküls die grösste Energie liefert, könnte es möglich sein, dass die Tumorzelle die nötige Wachstumenergie von wo anders beziehen muss. Die Tumorzelle kann in vivo wie das Herz mit Monoiodessigsäure nicht vergiftet werden. Hier besteht nun die Möglichkeit, dass die Tumorzelle wie das Herz die Milchsäure vom Blute für ihre Energiezwecke bezieht. Durch diese Hypothese bestand meine Aufgabe darin, die Milchsäure durch die Milchsäuredehydrogenase zu beseitigen und deren Einfluss auf das Tumorgewebe zu prüfen.

EIGENE VERSUCHE

1. Teil: Versuche mit Hefeextrakt

Für die ersten Versuche wurde die Milchsäuredehydrogenase aus der Hefe nach den kombinierten Methoden von Bernheim (14) und Boyland (15) gewonnen. Vor längerer Zeit wurde durch Protti (16) angegeben, dass eine spezifische Beeinflussung von malignem Gewebe durch lebende Hefen in vitro im Sinne einer Carcinolyse möglich sei, und dass auch in vivo durch Injektion von Hefesuspensionen eine Wachstumshemmung menschlicher und tierischer Neoplasmen erreicht werden könne.

Die Befunde Prottis wurden mehrfach durch Castelli, Gaggini (17) und Gottschalk (18) bestätigt. In günstigen Fällen zeigte sich sogar ein gänzlicher Schwund der Tumoren. Zur Erklärung eines Heilerfolges durch Hefen und Pilze, der übrigens auch schon von Jacubson (19) gezeigt worden war, wurden viele Faktoren herbeigezogen, unter anderen die Vitamine, Fermente oder unbekannte Wirkstoffe.

Die Milchsäuredehydrogenase wurde folgenderweise hergestellt:

1. 500 gr Hefe werden in kleine Stücke geschnitten, welche dann 8 bis 10 Stunden an der Luft liegen gelassen werden.

2. Die kleinzerstückelte Hefe wird dann 4 mal mit je 250cc Azeton übergossen, welches wieder mit einer Filterpumpe abgesaugt wird. Die Hefe wird dann so schnell wie möglich getrocknet.

3. 10 gr des Präparates werden in 100CC M/10 Phosphat Puffer Ph 8.4 über Nacht bei einer Temperatur von 0 - 5° C stehen gelassen.

4. Die Suspension wird dann zentrifugiert. Die klare Flüssigkeit, welche die Milchsäuredehydrogenase enthält, wird auf ein Ph von 7.4 eingestellt.

5. Test: 2 CC der Flüssigkeit werden mit 1 CC M/20 Laktat und 1CC 1: 5000 Methyleneblau gemischt. Die Reduktionszeit sollte ungefähr 10 Minuten dauern.

Für diese Versuche wurden weisse Mäuse vom Betatron Institut in Bern benützt. Diese Mäuse wurden intraperitoneal mit 0.2CC des Ehrlichschen Ascitessarcomes injiziert. Beliebige Ausstriche der Ascitesflüssigkeit wurden nach Papanicolaou gefärbt. Mit den ersten Versuchen wurde auch Berolase eingespritzt, mit der

Ueberlegung, dass durch den Abbau der Brenztraubensäure der Abbau der Milchsäure beschleunigt würde, da ein Teil der Milchsäure in Brenztraubensäure übergeht. Die Applikation der Berolase beeinflusste aber den Verlauf der Experimente zu wenig, um signifikante Resultate zu erwähnen. Im 3. Versuch wurde die Berolase nicht mehr injiziert.

1. Versuch

10 Mäuse mit dem durchschnittlichen Gewicht von ungefähr 18 gr wurden täglich mittags mit 0.25CC Hefeextrakt und .25CC Berolase, und abends um 7 Uhr mit .5CC Hefeextrakt und .5CC Berolase in die Bauchhöhle injiziert. Das Gewicht wurde täglich bestimmt. Die Behandlung begann sofort mit der Ueberimpfung des Ascitestumors. Wie aus den Gewichtskurven hervorgeht (Abb. 1), trat nach der intraperitonealen Injektion eine deutliche Hemmung im Wachstum des Mäuseascites ein, welche durch Punktion des Ascites und Mitosezählung bestätigt wurde. Es ergab sich, dass die unbehandelten Mäuse im Durchschnitt 15 Mitosen per 1000 gezählte Tumorzellen aufwiesen, während die behandelten Mäuse nur drei Mitosen per 1000 Tumorzellen zeigten. Gesunde Mäuse ohne Tumor zeigten nach intraperitonealer Injektion der gleichen medikamentösen Dosen nur geringe Störungen des Allgemeinverhaltens und eine initiale Gewichtsabnahme von 1 - 2 gr. Die intraperitoneal behandelten Tiere nahmen nicht weiter an Gewicht zu, lebten aber im Durchschnitt auch nicht länger als die Kontrolle.

2. Versuch

Der Versuch wurde wie der erste ausgeführt, nur wurden die Dosen vermindert, indem täglich 0.2CC Hefeextrakt und 0.1CC Berolase intraperitoneal injiziert wurden. Es wurden 5 Versuchstiere und 5 Kontrollen verwendet (Abb. 2). Im weiteren wurde die Behandlung erst am 4. Tag nach der Ascitestumorimpfung vorgenommen. Es zeigte sich, dass sich diese kleinen Dosen gerade der Grenze der Wirksamkeit annäherten. Zwei der 5 Versuchsmäuse zeigten nach dem 9. Tag eine erhebliche Gewichtserhöhung, welche durch den Ascites bedingt war. Die Mäuse wurden sofort mit einer höheren Dose von 0.5CC Hefeextrakt injiziert, welches in 24 Stunden einen Abfall des Gewichtes um über 2 gr bewirkte. (Abb. 2a). Der Unterschied in der Ascitesentwicklung ist aus der Abb. 3 ersichtlich.

3. Versuch

Der Versuch wurde wie der 1. und 2. ausgeführt, doch wurden die Versuchsmäuse erst nach dem 7. Tage nach der Ascitestumorimpfung behandelt. Es wurden 5 Versuchstiere und 5 Kontrollen verwendet. Diesmal wurden höhere Dosen von

Hefeextrakt, nämlich 0.8CC, verwendet. Die Versuchsmäuse hatten wie die Kontrollen nach 7 Tagen einen erheblichen Ascites. Im Durchschnitt hatten die Mäuse 3 gr an Gewicht zugenommen. Nach der intraperitonealen Applikation von Hefeextrakt hatten die Versuchsmäuse im Durchschnitt innert 24 Stunden 3.5 gr an Gewicht verloren. Die toxische Wirkung dieser Dose von Hefeextrakt, wie auch der wahrscheinlich entstehenden Zerfallsprodukte, war so gross, dass nur zwei der 5 Versuchstiere 48 Stunden überlebten.

Mikroskopischer Befund

Die mikroskopische Untersuchung erfolgte dadurch, dass man den Mäuseascites punktierte, und dann dieses Präparat nach Papanicolaou färbte.

Fünf unbehandelte Mäuse wurden als Kontrolle mit dem folgenden Resultat punktiert:

Per 1000 gezählte Zellen fand man im Durchschnitt
17 Mitosen
10 mehrkernige Riesenzellen
3 degenerierte Tumorzellen

Die Mäuse wurden dann mit Hefeextrakt behandelt und nach einer halben Stunde wurden sie wieder punktiert. Folgende Veränderungen hatten stattgefunden:

Per 1000 gezählte Tumorzellen fand man:

1	Normale Mitosen	
12	Pathologische Mitosen	(Abb. 4)
92	Mehrkernige Riesenzellen	(Abb. 5)
18	Vakuolisierte Tumorzellen	(Abb. 4)
3	Pyknotische Mitosen	
75	Degenerierte Tumorzellen	(Abb. 6)

Dieselben Versuchsmäuse wurden dann ohne Behandlung nach 24 Stunden wieder punktiert:

Per 1000 gezählte Tumorzellen fand man:

2	Normale Mitosen	
0	Pathologische Mitosen	
80	Mehrkernige Riesenzellen	
15	Pyknotische Mitosen	(Abb. 6)

Vakuolisierte Tumorzellen und degenerierte Zellen waren bis auf 50% erhöht. Es wird vermutet, (20) dass die amitotisch entstandenen mehrkernigen Riesenzellen nicht mehr imstande sind, eine Plasmateilung durchzumachen. Im weiteren fand man nach 24 Stunden eine Nukleolus-Nukleus Grössenverschiebung, zugunsten

des Nukleolus. (Abb. 7 & 8) Es wird angenommen, dass diese Grössenverschiebung das Resultat einer Stoffwechselstörung im Bereiche des Kernes ist. Der gewöhnliche unbehandelte Nukleolus der Tumorzelle mass durchschnittlich 7 Einheiten. Nachdem das Versuchstier behandelt wurde und 24 Stunden verstrichen waren, vergrössertensich 78% der Nukeoli auf fast das Doppelte.

Zusammenfassung des ersten Teiles

Versuche mit Hefeextrakt

1. Der Hefeextrakt, der die Milchsäuredehydrogenase enthält, wirkt Mitosehemmend. Zur gleichen Zeit kommt es zu einem Ascites- und Gewichtsverlust.

2. Der Hefeextrakt enthält toxische Substanzen, welche bei höheren Dosen schädlich wirken.

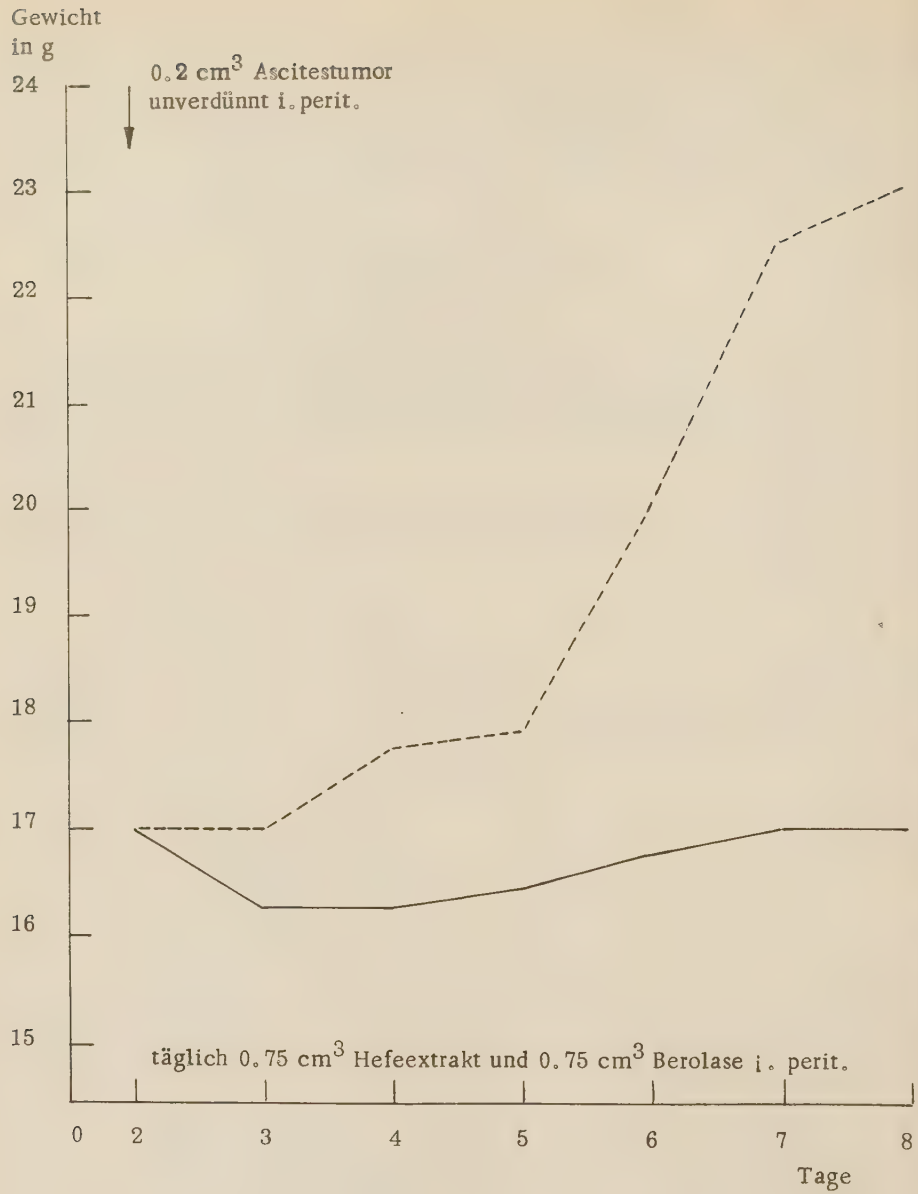

Abb. 1

Zwei Durchschnittsgewichtkurven von Mäusen

Ausgezogene Kurve: 10 behandelte Tiere,
Gestrichelte Kurve: 10 Kontrollen

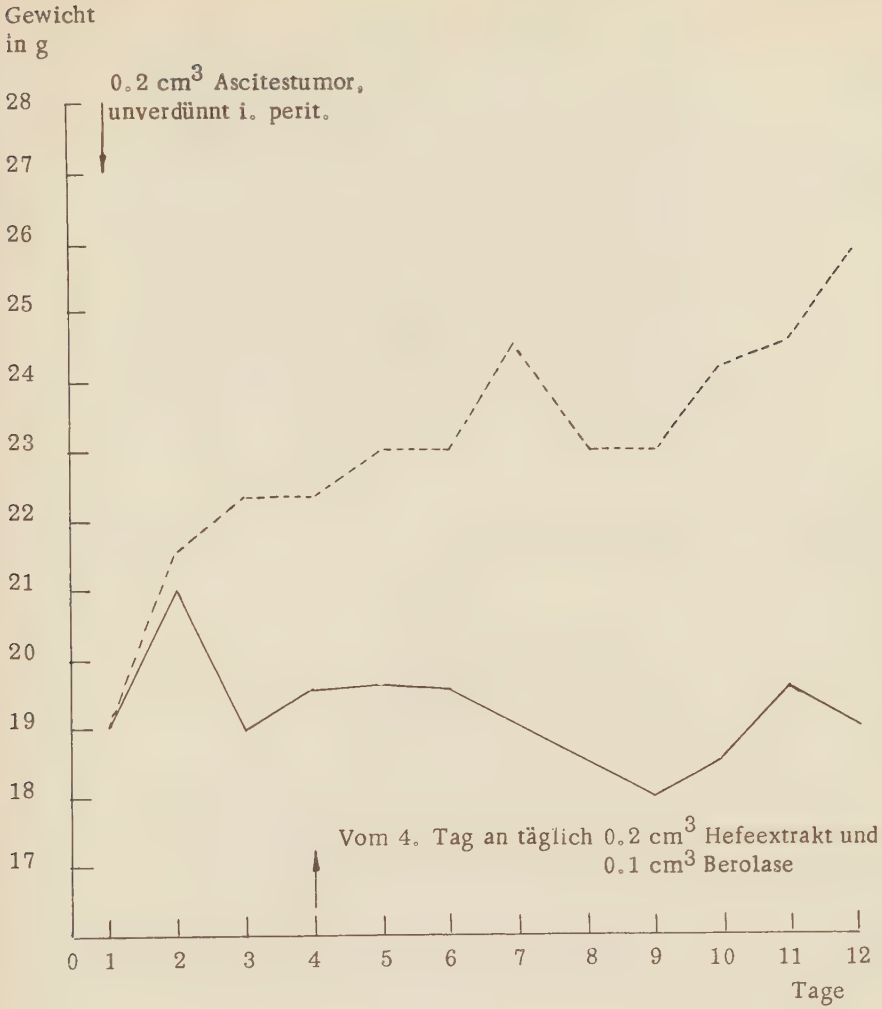

Abb. 2

Zwei Durchschnittsgewichtkurven von Mäusen.

Ausgezogene Kurve: 5 behandelte Tiere
Gestrichelte Kurve: 5 Kontrollen

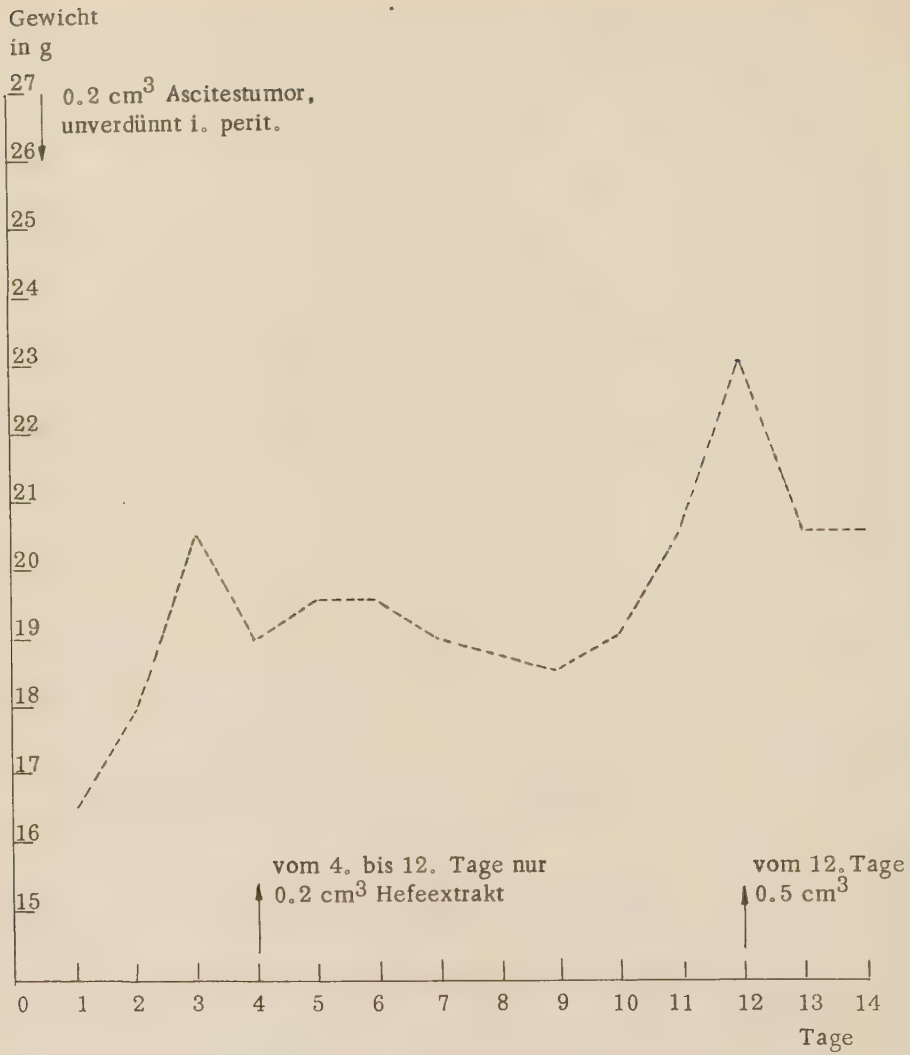

Abb. 2a

Diese Kurve einer behandelten Maus zeigt, dass die Dose von 0.2 cm 3 Hefeextrakt gerade die Grenze ist, welche überhaupt eine Wirkung auf den Mäuseascites hat. Eine Dose von 0.5 cm^3 Hefeextrakt bewirkt einen sofortigen Gewichtssturz von 2 1/2 gr.

Abb. 3

Zwei Mäuse mit am gleichen Tage übertragenen Ascitestumor. Rechte Maus: Mit Hefeextrakt intraperitoneal behandelt, fast kein Ascites. Linke Maus: Unbehandelte Kontrolle.

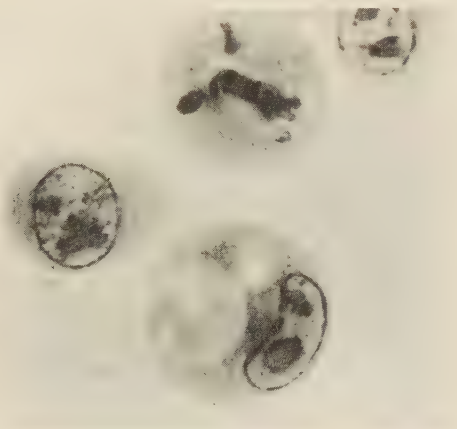

Abb. 4

Obere Zelle: Pathologische Mitose mit Chromosomenabsprengung und - Verklumpung.
Untere Zelle: Vakuolisierte Tumorzelle
(Färbung nach Papanicolaou)

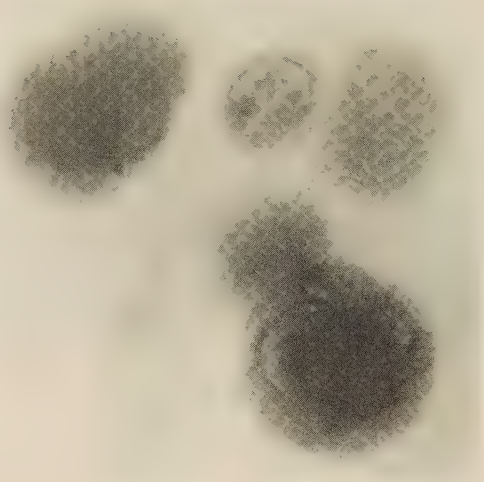

Abb. 5

Mehrkernige Riesenzellen
(Färbung nach Papanicolaou)

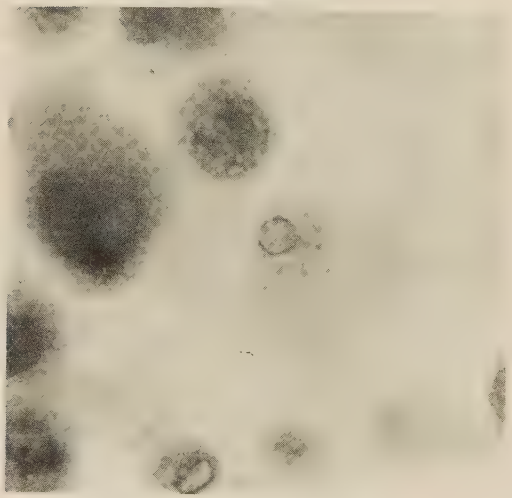

Abb. 6

Mittlere Zelle: Vakuoläre Degeneration. Zelle links aussen: Pyknotischer Kern.
(Färbung nach Papanicolaou)

Abb. 7

Unbehandelte Tumorzelle. Grösse des Nukleolus 7 Einheiten.

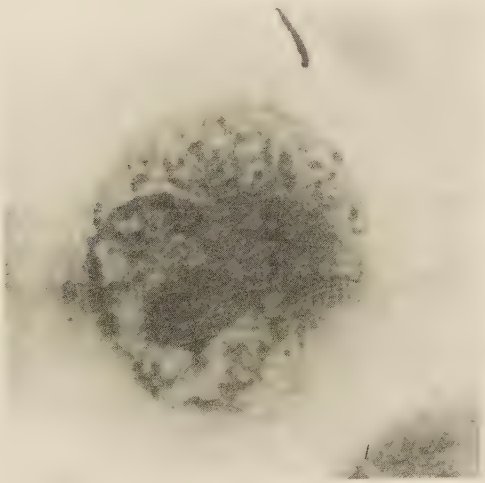

Abb. 8

Mit Hefeextrakt behandelte Tumorzelle, nach 24 Stunden: 78 % der Nukleoli um fast das Doppelte vergrössert.
(13 Einheiten).

2. Teil

Die Substanzen Milchsäuredehydrogenase, DPN und Cytochrom C wurden von der "Sigma Chemical Company" in St. Louis USA bezogen. Die kristallisierte Milchsäuredehydrogenase, welche aus Hasen-Muskelgewebe gewonnen wurde, war in einer 0.6%igen gesättigten Ammonium-Sulfat-Suspension enthalten. Das DPN ein Diphosphopyridinnucleotid und das Cytochrom C wurden als Trockenkristalle geliefert.

Das Apo-Ferment ist ein hochmolekularer Proteinkörper, der sehr temperaturempfindlich ist, während das Co-Ferment chemisch eine einfachere thermostabile Verbindung herstellt. Die Trennung des Gesamtfermentes in einen Apo- und einen Co-Anteil wurde nach Willstätter (21) in dem Sinne aufgefasst, dass das Apo-Ferment den spezifischen kolloiden Träger, und das Co-Ferment die aktive, sogenannte prosthetische Gruppe, darstellen. Die Mitochondrien und Mikrosomen der Zelle enthalten, strukturell gebunden, bestimmte am Citronensäurecyclus beteiligte Fermentsysteme, welche als Fermenteinheiten höherer Ordnung aufgefasst werden müssen. Es handelt sich hierbei nicht um eine blosse Adsorption von Fermenten an diese Zellteilchen, sondern um eine organisierte Lokalisierung. Die Co-dehydrogenasen üben keine echte katalytische Wirkung aus, sondern dienen lediglich als Donatoren-Acceptoren für Wasserstoff. Sie sind somit eher mit den Cytochromen zu vergleichen, welche die gleiche Funktion bezüglich der Elektronen ausüben (22).

Wir können nach Baldwin (23) die Gruppen nach ihrer Spezifität einteilen. Die Milchsäuredehydrogenase, welche aus Muskelgewebe bezogen wird, ist DPN-spezifisch. Die Milchsäuredehydrogenase aus Hefe ist Cytochrom-spezifisch. Die Cytochrome sind eisenhaltige reversible Redoxsysteme.

Die Dosierung eines Fermentes ist, wegen dessen Reaktionsfähigkeit, ausserordentlich wichtig. Nach Evans (24) geschieht folgendes: Das Apo-Ferment verbindet sich erst mit dem Co-Ferment. Durch diese Reaktion wird das Co-Ferment verändert. Durch das Endprodukt der Reaktion wird das Apo-Ferment entgegengesetzt beeinflusst, indem die Reaktion entweder verlangsamt oder vollkommen umgekehrt verläuft. Mit anderen Worten, kann bei Ueberdosierung die Reaktion nach einer kurzen Zeit umgekehrt verlaufen. Andere Faktoren, welche die Reaktion beeinflussen, sind noch das Ph und die Temperatur. Die Reaktion zwischen Ferment und Substrat lässt sich auch mathematisch verfolgen. Die ersten Versuche wurden von Victor Henry (25), Michaelis (26) und Menton (27) gemacht. Nach Lang (28a) variiert die Konzentration des DPN in den Organen zwischen 100 und 300 mg/kg oder rund 300 Mikromol/kg Frischgewicht. Der Gehalt eines Organes an Apo-Dehydrogenasen beträgt etwa 10g/kg oder etwa 100 Mikromol/kg, wenn als Teilchengewicht 100,000 und 1% des Organs als Apo-Dehydrogenase ange-

nommen wird Es folgt hieraus, dass DPN gar nicht im Ueberschuss vorhanden ist, wobei aber zu bedenken ist, dass das DPN an den Mitochondrien strukturgebunden ist und somit nicht quantitativ in Organextrakten zutage tritt.

Die obigen Daten gaben eine Basis zur Dosierung.

Dosierung der Medikamente und deren toxische Eigenschaften für Mäuse, wenn intraperitoneal injiziert.

1. 2mg der DPN Kristalle wurden in 0.5CC physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst. Nicht toxisch. Die dreifache Dosis zeigte auch keine toxischen Eigenschaften.

2. Genau dasselbe Verfahren wurde mit den Cytochrom C Kristallen versucht. Bei allen Dosen löste das Cytochrom C eine starke Juckwirkung aus, welche aber immer nach 24 Stunden wieder verschwand.

3. 0.05CC der Milchsäuredehydrogenase-Suspension wurden mit 0.5CC physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.
   0.1CC einer Penicillin-Streptomycin-Mischung wurden noch beigefügt, um die Suspension steril zu halten. Diese Dose zeigte keine sofortige Toxicität. Nach mehreren täglichen Injektionen zeigte die Maus eine gewisse Müdigkeit, verbunden mit Koordinationsstörungen, auch Ataxie und Muskelzittern, speziell der Nackenmuskulatur. Wurden die Dosen jetzt erniedrigt oder weggelassen, dann erholte sich die Maus. Im anderen Falle waren die Störungen irreversibel und führten nach einigen Tagen zum Tod.
   Dieselbe Dose war vollkommen harmlos, wenn sie intramuskulär oder subkutan injiziert wurde.
   Lethale Dose: 0.1CC der Milchsäuredehydrogenase.
   Nach ein bis zwei Minuten wird die Maus sichtlich unwohl mit rascher und erschwerter Atmung. Es entsteht eine Hyperreflexie, welche durch einen Schlag auf den Tisch demonstriert werden kann. Bald bemerkt man muskuläre Krämpfe, speziell der Hinterbeine. Diese Krämpfe breiten sich innerhalb weniger Minuten über den ganzen Körper der Maus aus und künden den Tod des Tieres an. Werden die Dosen langsam im Laufe eines Tages auf die lethale Dose erhöht, dann entsteht ebenfalls eine Hyperreflexie, welche in diesem Falle jedoch in eine vollständige und tödliche Lähmung der Maus übergeht.
   Die doppelte lethale Dose, 0.2CC, wurden Ratten interperitoneal und intravenös gespritzt Die Ratten zeigten keine Veränderungen.

Nach den obigen Ueberlegungen ging es nun darum, herauszufinden, ob die Milchsäuredehydrogenase, das DPN, oder das Cytochrom C allein oder in den verschiedenen Kombinationen der Tumorzelle schädlich sind.

Obwohl die Milchsäuredehydrogenase, welche von Muskelgewebe erhalten wird, nicht Cytochrom-spezifisch wirkt, wurde das Cytochrom C in diesen Versuchen aus folgenden Gründen verwendet: Die Cytochrome sind, wie oben erwähnt, keine Atmungsfermente, sondern reversible Redoxsysteme. Sie schalten sich in einer bestimmten Reihenfolge zwischen dem Atmungsferment und dem gelben Ferment ein, wobei ein Elektronentransport bis zum Atmungsferment hin stattfindet. Die gelben Fermente hingegen reagieren mit DPN im Sinne eines Wasserstofftransportes (Dewan, Green (28)), (Euler, Hellström (29)).

1. Versuch

Der erste Versuch wurde in vitro ausgeführt. Jedes Reagensglas wurde mit 0.2CC einer 7 tätigen Ascitesflüssigkeit, welche mit 0.4CC physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde, beschickt. Die zugegebenen Dosen waren:

Milchsäuredehydrogenase: 0.075CC
DPN: 2mg in 0.5CC physiol. NaCl
Cytochrome C: 2mg in 0.5CC physiol. NaCl

Die Reagensgläser wurden dann sofort über Nacht in einen Brutschrank mit 37° Celsius gestellt. Am nächsten Morgen wurde ein Ausstrich von jedem Reagensglas gemacht, welcher nach Papanicolaou gefärbt wurde.

Resultat:

1. Kontrolle: Tumorzellen und deren Mitosen klar sichtbar, jedoch etwas gequollen.

2. DPN: Vakuolen in den Tumorzellen. Viele Zellen nehmen die Färbung schlecht an.

3. Milchsäuredehydrogenase: Die Mehrzahl der Zellen wurden aufgelöst, Zelltrümmer, nur einzelne Zellen erhalten.

4. Cytochrome C: keine Veränderung der Tumorzellen.

5. Milchsäuredehydrogenase und DPN: Auflösung vieler Zellen mit Zelltrümmern, aber weniger Veränderungen als in 3.

6. Milchsäuredehydrogenase und Cytrochrome C: Teilweise Zerstörung mit Vakuolen und pathologischen Mitosen, jedoch keine Auflösung der Zellen.

7. Milchsäuredehydrogenase und DPN und Cytochrome C: wie 6.

8. DPN und Cytochrome C: wie 2.

Zusammenfassung:

Es ist deutlich zu sehen, dass in vitro diese Menge von Milchsäuredehydrogenase imstande ist, die Tumorzellen zu zerstören. DPN schädigt die Tumorzellen auch in einem gewissen Grade, jedoch viel weniger als die Milchsäuredehydrogenase. Die Milchsäuredehydrogenase wird durch DPN etwas, durch Cytochrome C beträchtlich, inhibiert.

2. Versuch

Derselbe Versuch wurde nun in vivo mit 12 Versuchsmäusen und 12 Kontrollen ausgeführt. Dieselben Dosen und Kombinationen wie in vitro wurden benutzt. Die Versuchsmäuse wurden täglich intraperitoneal injiziert. Das Resultat zeigte keinen erheblichen Unterschied zwischen den Versuchstieren und den Kontrollen. Wahrscheinlich wurden die intraperitoneal gespritzen Fermente zu schnell resorbiert um eine Wirkung auszulösen.

3. Versuch

Für diesen Versuch wurden 0.2CC einer Ehrlich Ascites Flüssigkeit intramuskulär in die beiden Oberschenkel zweier Mäuse injiziert. Nach einer Woche sah man eine deutliche Vergrösserung der Oberschenkel mit einem zunehmenden Funktionsausfall, bedingt durch das Wachstum des jetzt festgewordenen Ehrlich Tumors.

In diesem Falle wurde der rechte Oberschenkel von Maus I und der linke Oberschenkel von Maus II behandelt, während die anderen Oberschenkel zur Kontrolle dienten. Maus I wurde nur mit der Milchsäuredehydrogenase behandelt und zwar mit einer Dose von 0.2CC, die doppelt intraperitoneale lethale Dose, verdünnt mit 0.5CC physiologischer Kochsalzlösung. Diese Dose wurde täglich intramuskulär in den wachsenden Tumor injiziert. Maus II erhielt täglich 4mg DPN in 0.5CC physiologischer Kochsalzlösung in den linken Oberschenkel injiziert. Nach der ersten Woche wurden, mit einem speziell angefertigten Messband, beide Oberschenkel jeder Maus täglich gemessen und verglichen.

Resultat

Beide Oberschenkel der Versuchsmäuse zeigten nach einer Woche eine gleichmässige Vergrösserung im Umfang. Nach 4 weiteren Tagen wurde der rechte Oberschenkel der Maus I zum ersten Mal mit der Milchsäuredehydrogenase, der linke Oberschenkel von Maus II mit DPN, injiziert. Nach dem zweiten Tag der Behandlung verlor der rechte Oberschenkel von Maus I bis 15mm Umfang (Abb. 11). Der linke Oberschenkel von Maus I, welcher nicht behandelt wurde, verlor am fünften Tag 7mm an Umfang (Abb. 9). Die Maus starb am 6. Tag nach der Behandlung. Maus II zeigte nach derselben Zeit eine progressive Umfangszunahme beider Oberschenkel von 25 beziehungsweise 15mm, also keine Umfangsabnahme (Abb. 10). Der pathologische Befund des behandelten Oberschenkels von Maus I erwies ausgedehnte Nekrosen des Tumorgewebes. Einzelne Teile des Muskelgewebes waren auch nekrotisch.

Zusammenfassung des Versuches

Die Milchsäuredehydrogenase zeigte einen deutlichen Effekt auf das Tumorgewebe, speziell wenn direkt injiziert. Der unbehandelte Oberschenkel zeigte nach mehreren Tagen auch eine Abnahme des Umfanges. Ob das ein indirekter Effekt der Milchsäuredehydrogenase-Behandlung war, ist fraglich. Die Dosierung war zu hoch, da auch ein wenig Muskelgewebe nekrotisch wurde. Das DPN zeigte mit der obigen Dosierung keinen Tumorzerstörenden Effekt.

4. Versuch

Vier Mäuse mit je einem festen transplantierten subcutanen Ehrlich Tumor wurden für diesen Versuch benützt. Zwei dieser Mäuse dienten als Kontrolle. Die subcutanen Tumoren waren Mandelgross. Den Versuchstieren wurden täglich, 6 Tage lang, 0.5CC Milchsäuredehydrogenase direkt in den Tumor injiziert. Einer der Tumoren zeigte nach der dritten Injektion eine starke Nekrotisierung und Verflüssigung, welche sich mit vielen Fisteln nach aussen entleerte. Die Experimente mit subcutanen Tumoren waren aber nicht verwertbar, da auch die unbehandelten Tumoren schon frühzeitig nekrotisch wurden.

5. Versuch

Diesmal wurde die Milchsäuredehydrogenase statt mit NaCl mit Sesamoel verdünnt, mit der Ueberlegung, dass man weniger Milchsäuredehydrogenase mit grösserem Effekt spritzen könnte. Die Milchsäuredehydrogenase-Kristalle sollten wie bei einer Depotinjektion nur langsam verbraucht werden. Es wurden 0.1CC

der Milchsäuredehydrogenase verdünnt in 0.2CC sterilem Sesamöl täglich intramuskulär gespritzt. Die Maus war wieder an beiden Oberschenkeln mit dem flüssigen Ascitestumor überimpft worden, welcher nach einer Woche zu einem festen Tumor wurde. Die Behandlung begann am 9. Tag nach der Ueberimpfung des Ascitestumors.

Resultat

Beide Oberschenkel wuchsen progressiv an Unfang über 15mm. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen dem linken und dem rechten Oberschenkel. Der pathologische Befund ergab, dass die Nekrosen im behandelten Oberschenkel nicht nur im Tumorgewebe, sondern auch im Muskel gleich stark vorhanden waren. Dagegen waren die Nekrosen nur lokal verstreut, mit dazwischenliegenden intaktem Tumor- und Muskelgewebe. Das Oel hatte also wahrscheinlich die Diffusion der Milchsäuredehydrogenase in einem solchen Grade verzögert, dass die Reaktion in stärkster Weise nur lokal stattfinden konnte.

6. Versuch

Diesmal wurde die Milchsäuredehydrogenase zum ersten Mal in einen menschlichen Tumor eingespritzt. Es handelte sich um eine 45jährige Patientin mit ausgedehnten Hautmetastasen nach einem beidseits operierten Mamma-Carcinom. Die Hautmetastasen waren als erbsengrosse Tumoren über der Haut sichtbar, doch konnte man sie durch Palpation als grössere Gebilde noch unter der Haut verfolgen. Es handelte sich um Metastasen eines Carcinoma solidum scirrhosum in der Rückenhaut. Dies wurde durch eine Biopsie erwiesen. Vorsichtshalber wurden in diesem Experiment nur 0.03CC Milchsäuredehydrogenase, also eine für Mäuse harmlose Dose gespritzt. Die Milchsäuredehydrogenase wurde mit 0.5CC physiol. NaCl verdünnt. 0.5CC einer Penicillin-Streptomycin Mischung wurden noch beigefügt. Die Patientin erhielt zwei gleich grosse Injektionen. Die zweite Injektion wurde nach 24 Stunden gegeben. Beide Injektionen wurden direkt in den oberflächigen erbsengrossen Tumor, unter die Rückenhaut eingespritzt. Die Patientin hatte nach beiden Injektionen weder Schmerzen noch ein Gefühl des Unwohlseins.

Resultat

12 Stunden nach der 2. Injektion zeigte sich an der Injektionsstelle eine 2:1 cm bräunliche Verfärbung der Haut, welche bis zur Biopsie sistierte. 24 Stunden nach der 2. Injektion war der erbsengrosse Tumor verschwunden. Tiefer unter der Haut, dem Auge nicht mehr sichtbar, konnte man noch einen grösseren Tumor palpieren. Die Biopsie der behandelten Stelle erwies keine Veränderung des Tumors.

7. Versuch

Eine 40jährige Patientin mit erbsengrossen Hautmetastasen auf der linken Brustseite, nach operiertem linkem Mamma-Carcinom (Abb. 12). Es handelte sich um Metastasen eines Carcinoma solidum scirrhosum et medullare. Die Patientin wurde zweimal mit 0,055CC Milchsäuredehydrogenase und 0,2CC eines Penicillin-Streptomicin-Gemisches, direkt in den angezeichneten Tumor injiziert, behandelt. Die zweite Injektion erfolgte nach 24 Stunden. Die Patientin wurde nach 48 Stunden zum erstenmal kontrolliert.

Resultat

Der Knoten war verschwunden, statt dessen sah man eine bräunlich-schwärzliche Kruste. Die Haut war beim Betasten glatt und nicht mehr mit dem Untergewebe verwachsen (Abb. 13). Subjektiver Befund der Patientin: Die Patientin behauptete, dass auch die in der Nähe liegenden Knoten kleiner und weicher geworden seien. Sie hatte den behandelten Knoten beobachtet und bemerkte 6 Stunden nach der Injektion eine bläuliche Verfärbung, welche mit der Abnahme des Knotens immer dunkler wurde. Nach 24 Stunden sei der Knoten fast verschwunden gewesen.

Eine Biopsie des behandelten Knotens erwies:

Das Gewebestück ist in den seitlichen Partien von intakter Epidermis bedeckt. Zentral fehlt in einem umschriebenen Bezirk der epitheliale Ueberzug und ist durch fibrinös-Leukozytäres, z.T. eingedicktes Exsudat ersetzt. Darunterliegendes Corium in den oberflächlichsten Schichten ebenfalls total nekrotisch und von neutrophilen Leukozyten infiltriert. Im Corium ein mässig scharf begrenzter Knoten von Tumorgewebe, welches in den Randpartien noch erhalten ist und sich aus kleinen Nestern, schmalen oder selten mittelbreiten soliden Strängen aufbaut. Tumorzellen mittelgross bis gross, rundlich oder polyedrisch, mit spärlich bis mässig reichlich dunklem, selten von kleinen hellen Vakuolen durchsetztem Protoplasma. Kerne mittelgross bis gross, rundlich oder leicht polymorph, wechselnd chromatinhaltig, teilweise chromatinreich, oft auch bläschenförmig, mit einem oder mehreren deutlichen, grossen Nukleolen. Einige Mitosen. Stroma bindegewebig, spärlich, mässig zellreich, teilweise leichthyalin, mit Infiltration von neutrophilen Leukozyten. Im Zentrum dieses Knoten sind das Tumorgewebe und das bindegewebige Stroma partiell oder total nekrotisch. Färbbarkeit der Kerne an diese Stellen teilweise völlig aufgehoben, hie und da auch deutliche Karyorrhexis. Die Infiltrate mit neutrophilen Leukozyten sind besonders in der Nachbarschaft der Nekrosen dicht. Zentral in der Nekrose eine homogene, hyaline, eosinophile, van-Gieson-gelbe Masse. Die Grenze zwischen erhaltenem und nekrotischem Tumorgewebe einerseits und erhaltenem und nekrotischem bindegewebigem Stroma anderseits liegt nicht erkennbar auseinander.

Die drei andern Knoten, welche auf Abb. 13 ersichtlich sind, wurden ebenfalls nacheinander mit nur einer Dose von 0.05 Milchsäuredehydrogenase behandelt. Es zeigte sich eine langsamere Verkleinerung der Knoten, jedoch ohne Krustenbildung. Diese Dose war aber nicht genügend, um die Knoten zum vollkommenen Schwund zu bringen. Nach vier Wochen vergrösserten sich alle Knoten um die Injektionsstelle wieder. Der Zweck dieses Versuches war aber vorläufig nur den Einfluss der Milchsäuredehydrogenase auf Tumorzellen zu prüfen und nicht die tieferen Schichten des Knotens zu zerstören, um einen Vergleich des behandelten Gewebes mit intaktem Tumorgewebe zu gestatten.

8. Versuch

Dieser Versuch wurde in vitro ausgeführt. Das Blut wurde von einem elfjährigen Mädchen mit einer akuten Paramyeloblastenleukemie (100,000 Zellen) entnommen. Der Versuch begann sofort nach der Entnahme des Blutes, welches mit Na Citrat ungerinnbar gemacht worden war und wurde folgenderweise ausgeführt:

Blut	+	Milchsäuredehydrogenase
0.5CC		0.2CC
1.0CC		0.1CC
1.0CC		0.05CC
1.0CC		0.025CC

I CC Blut diente als Kontrolle. Die Ausstriche, welche nach Pappenheim gefärbt wurden, wurden nach 15 Minuten, 1 Stunde und 12 Stunden angefertigt.

Resultat

Ausstriche nach einer Stunde und 12 Stunden waren nicht verwertbar, da die Paramyeloblasten auch in der Kontrolle stark degeneriert waren. Nach 15 Minuten zeigte sich eine starke Degeneration der Paramyeloblasten im Reagensglas mit Milchsäuredehydrogenase, und zwar erschien die Degeneration am stärksten mit der kleinsten Dose, also 0.025CC Milchsäuredehydrogenase. Die Degeneration war selektiv, da die Erythrozyten sich scheinbar nicht verändert hatten. Nach 15 Minuten waren in der Kontrolle im Durchschnitt 15 bis 20 Paramyeloblasten per Gesichtsfeld sichtbar. Im Reagensglas mit 0.025CC Milchsäuredehydrogenase waren dagegen die Paramyeloblasten auf 2-5 Zellen per Gesichtsfeld vermindert. Die Paramyeloblasten waren entweder verschwunden oder man sah deren Gerüste und Trümmer.

Zusammenfassung des zweiten Teiles

Versuche mit Milchsäuredehydrogenase

1. Die Milchsäuredehydrogenase wirkt zerstörend auf Tumorzellen.

2. Die Milchsäuredehydrogenase diffundiert spärlich, wenn sie in einen Tumorknoten injiziert wird. Sie wirkt in dieser Konzentration auch zerstörend auf das normale Gewebe. Im Blute dagegen wirkt die Milchsäuredehydrogenase selektiv auf Tumorzellen.

3. Hohe Dosen von Milchsäuredehydrogenase sind tödlich für Mäuse.

4. Das DPN und das Cytochrom C zeigten keine tumorzerstörende Aktivität.

Weitere Versuche sind im Gange.

Ich bin Herrn Prof. Neuweiler und Frl. Zuppinger zu Dank verpflichtet für ihre grosszügige Unterstützung.

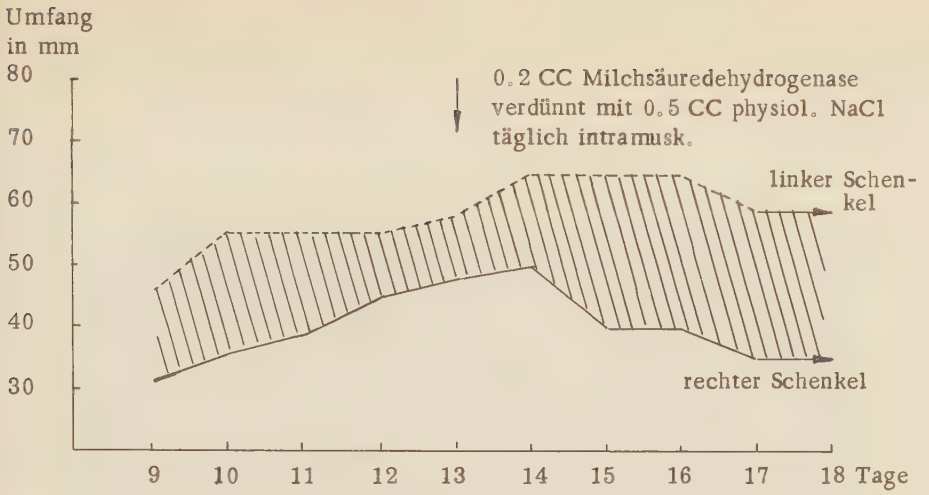

Abb. 9

Die zwei Kurven bedeuten den täglich gemessenen Umfang beider Oberschenkel einer Versuchsmaus, welche mit einem Ehrlich Tumor intramuskulär injiziert wurde.

Ausgezogene Kurve: Behandelter rechter Oberschenkel.

Gestrichelte Kurve: Unbehandelter linker Oberschenkel.

Versuchsmaus I: Wesentliche Umfangsabnahme des behandelten Oberschenkels.

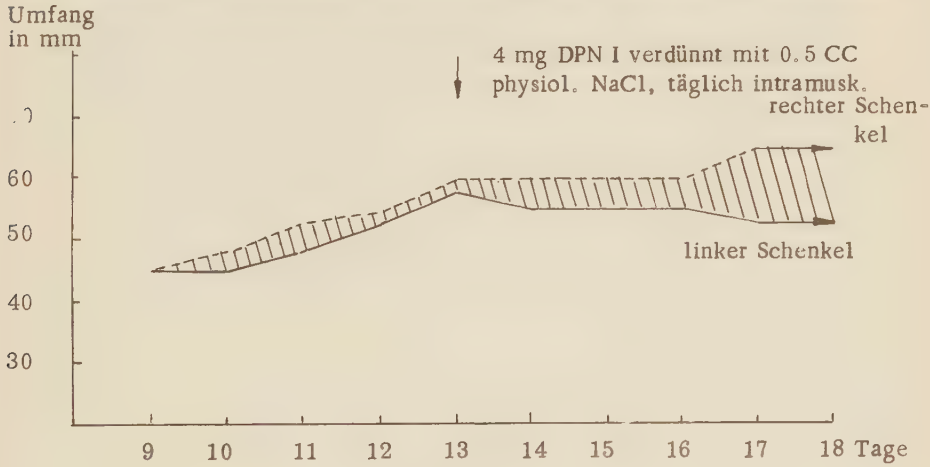

Abb. 10

Die zwei Kurven bedeuten den täglich gemessenen Umfang beider Oberschenkel einer Versuchsmaus, welche mit einem Ehrlich Tumor intramuskulär injiziert wurde.

Versuchsmaus II: Keine wesentliche Umfangsabnahme.

Ausgezogene Kurve: Behandelter linker Oberschenkel.

Gestrichelte Kurve: Unbehandelter rechter Oberschenkel.

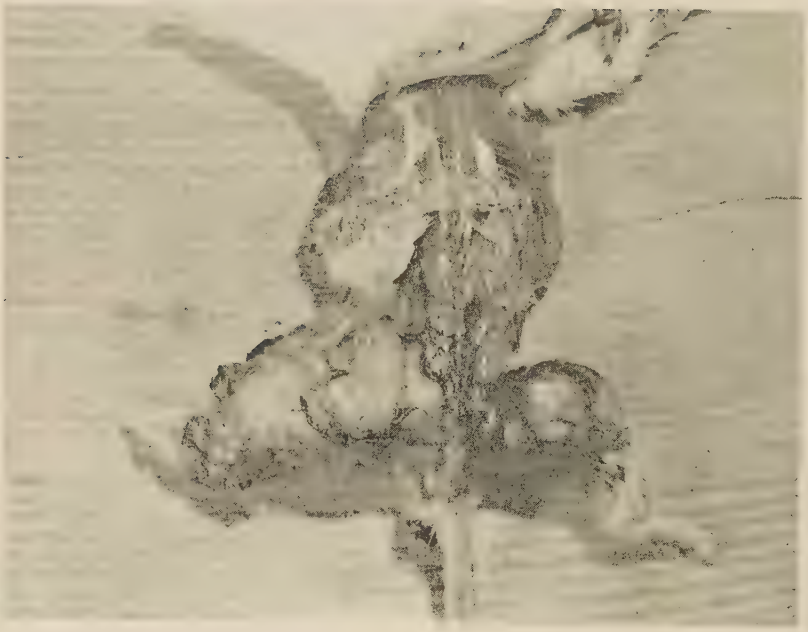

Abb. 11

Eine Maus mit einem injizierten Ehrlich-Tumor in beiden Oberschenkeln.
Rechter Oberschenkel mit Milchsäuredehydrogenase behandelt: Wesentliche Umfangabnahme (15mm) im Vergleich zum linken unbehandelten Oberschenkel.

Abb. 12

Hautmetastasen eines Carcinoma solidum scirrhosum et medullare auf der linken Brustseite nach einer Mamma Resektion. Die Hautmetastasen sind erbsengross

Abb. 13

Behandelte Hautmetastasen eines Carcinoma solidum scirrhosum et medullare nach einer Mamma - Resektion.

Der mittlere untere Knoten ist abgeflacht und zeigt 48 Stunden nach der 2. Injektion eine schwärzliche Kruste.

Die zwei Knoten links davon wurden nur mit einer Injektion von 0.05 Milchsäuredehydrogenase behandelt. Die Abbildung zeigt eine beginnende bläuliche Verfärbung der beiden Krusten.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Warburg O., "Ueber den Stoffwechsel der Karzinomzelle" Klin. Wschr. 1925, 4, 534 - "Verbesserte Methode zur Messung der Atmung und Glycolyse", Biochem. Zschr. 1924, 152, 11.
2. Warburg O., Posener und Negelein, "Ueber den Stoffwechsel der Karzinomzelle". Biochem. Zschr. 1924, 152, 309.
3. Warburg O., Wind und Negelein, "Ueber den Stoffwechsel der Tumoren im Körper" Klin. Wschr. 1926, 5, 829.
4. Harrison S.T. und E. Mellanby. "A note on the inhibitory effect of mono-iodo-acetic on lactic acid production by cancer tissue" Biochem. J. 25: 770. 1931 - Cr 6: 486. 1931. - A c 16 Abst. 9. 1932 - ZK 36: Ref. 84. 1932. - BA 7: 5936. 1933.
5. Lemon H.M., Walker B.S., Davoson Reynolds M.M., und Wotiz H. H. N. England J. Med. 251, S 937 - 944, 975 - 980, 1011 - 1017 (1954).
6. McGinty and Miller, Amer. J. Physio., 1933, 103, 712.
7. Evans, Grande, and Hsu. Q.J. Exp. Physiol. 1935, 24, 348.
8. Braun, Menendez, Chute & Gregory. Quart. J. Exp. Physiol. 1939, 29, 91.
9. Bogue, Evans & Gregory. Quart. J. Exp. Physiol. 1937, 27, 27.
10. Clark, Eggleton & Eggleton. J. Physio. 1931, 72, 25 P.
11. Clark, Q. J. Exp. Physiol. 1935, 25, 213.
12. Rostok P. " Künstliche Virulenzsteigerung bei Mäuseimpftumoren durch Milchsäure". Deutsche Med. Wchnschr. 47 : 1323 1921 -CA 17: 138. 1923.
13. Blumenthal,F., & P. Meyer. "Ueber den Acidum lacticum erzeugten Tumoren auf Mohrrübenscheiben". Ztschr. Krebsforsch. 21:250. 1923/24.- Ca 18: 2919. - CAP 35: 112. 1924/25.
14. Bernheim (1828, 11) 22, 1184.
15. Boyland (1923, 11) 27, 793.
16. Protti Arch. biol. Nank (russ) 35, 255 (1935) - Tumori 34, 5 (1949), 35, 4 (1949) . - Bell. Soc. med. chir. Prov. Varese 1949 H. 3.
17. Castelli und Gaggini: Rev. suisse Path. et Bacter. 1947.
18. Gottschalk & Münch. med. Wschr. 1951, 93.
19. Jacubson Z. Krebsforsch. 24, 346 (1927).
20. Wilhelm Homann "Zur Biologie des Mäuseascitescarcinoms" Zeitschrift für Krebsforschung Bd. 58, 511-523 (1952).
21. Willstätter R.: Hoppe - Seyl. Z. 208, 258 (1932).
22. Green D.E., Nordmann J.: "Exposis annuels Biochem. med." 15, 53 (1953).
23. Baldwin E.: "Dynamic Aspects of Biochemistry", University Press, Cambridge 1952.
24. Lovatt Evans: "Principles of Human Physiology". Chapter IX 92 (1949).

25. Diss. Paris 1903 "Lois générales de l'action des diastases".
26. Michaelis L., Menten M.L.: Biochem. Z. 49, 333 (1913).
27. Michaelis L., Menten M.L.: Biochem. Z. 49, 333 (1913).
28a. Lang K.: Die Biologie der Enzyme; in Biol. und Wirkung der Fermente. Springer, Berlin 1953.
28. Dewan J. G., Green D.E.: Nature 140, 1097 (1937), Biochem. J. 32, 626 (1938).
29. v. Euler H., Hellström H.: Hoppe Seyl. Z. 252, 31 (1938).

Weitere Referenzen

1. Summer J. Bio. Chem. 1926, 69, 435, 70, 97.
2. Northrop J. Gen. Physiol., 1931, 14, 713.
3. Northrop & Kunitz L. Gen. Physiol., 1932, 16, 267.
4. Summer, Kirk & Howell: J. Biol. Chem. 1932, 98, 543.
5. Caldwell & Shermann: Science, 1931 74, 37.
6. Northrop Science, 1937, 86, 479.
7. Summer & Sommers (1943) "Chemistry and Methods of Encymes"(New-York: Acade.Press Inc.).
8. Negelein "Versuche über Glycolyse", Biochem. Zschr. 1925, 158, 121.
9. Pentimalli F., "Ueber den Stoffwechsel des regenerierenden Gewebes", Zschr. für Krebsforschung 1927, 25, 347.
10. Schneider A., "Ueber das Auftreten der Milchsäure in höheren Pflanzen, insbesondere während der Keimung", "Planta" 1941/42, 32, 234.
11. Warburg O., & Minami, "Versuche am überlebenden Karzinomgewebe" Klin. Wschr. 1923, 2, 776.
12. Warburg O., "Milchsäuregärung der Tumoren". Klin. Wchschr. 6:2047, 2288. 1927.
13. Downess H.R., Lactic acid formation in tumor tissue". J.Cancer Res. 13:268. 1929.- BA 4:24868. 1930.- CR 5: 580. 1930. - IAC 4: 329. 1930.- ZK 30: Ref. 93. 1930.
14. Demuth F. "Verteilung von Milchsäure und Calcium in Gewebekulturen". Biochem. Zschr. 234:247. 1931.- BA 6: 13010. 1932.
15. Tamm A. "Ueber die Veränderungen des pH-Wertes der Alkalireserve und der Milchsäuremenge des Blutes Krebskranker".(In Esthonian.) 8 p. Dorpat, 1935.
16. Bernhard F. Glycogen-Glucose-, und Milchsäuregehalt in gut- und bösartigen Tumoren. Klin. Wchnschr. 7: 1184. 1928. - ZK 28: Ref. 16. 1928/29.- IAC 3: 340. 1929.- BA 4: 1287. 1930.
17. Bierich R. " Milchsäuregärung der Tumoren ". Klin. Wchnschr. 6:2287. 1927.- Rept. Internat. Conf. Cancer London, p. 61. 1928.- CR 3: 173. 1928.- IAC 3: 14 1929.

18. Bierich R. "Untersuchungen über das Zustandekommen der bösartigen Geschwülste". I. Der Milchsäuregehalt der Gewebe. Ztschr. Physiol. Chem. 155:245. 1926.- BGP 37:545. 1926.- CR 1:164. 1926.- CA 20:3731. 1926.- BA 3:13703. 1929.

19. Bierich R. & a. Rosenbohm. "Ueber den Milchsäuregehalt von normalen und von Krebsgeweben". Ztschr. Physiol. Chem. 214:271. 1933. - ZK 40: Ref. 17. 1933.- AJC 23:844. 1935.

20. Bierich R. & K. Kalle. "Untersuchungen über das Zustandekommen der bösartigen Geschwülste". IV. "Ueber den Gehalt von normalen und Krebsgeweben an Milchsäure Cytochrom, und Glutathion. Ztschr. Physiol. Chem. 164:207. 1927.- CR 2:465. 1927.- ZK 25:Ref-51. 1927.- IAC 2:10. 1928.- BA 3:13706. 1929.

21. Fulci F. "Contributo alla conoscenza dei costituenti chimici dei neoplasmi "Gazz. Internat. Med. 13: 509. 1910.- Arch. Farm. Sper. 10: 131, 145, 193. 1910.- Ztschr. Immunitätsf. Ref. 3:1072. 1910.- Boll. Soc. Lancisciana Osp. Roma 30:88. 1910.- CA 5:1794. 1911.

22. Warburg O., K. Poesener, & E. Negelein. "Ueber den Stoffwechsel der Carcinomzelle". Biochem. Ztschr. 152:309. 1924.- CA 19:2369. 1925.

23. Rostock P. "Künstliche Virulenzstegerung bei Mäuseimpftumoren durch Milchsäure". Deutsche Med. Wchnschr. 47:1323. 1921.- CA 17:138. 1923.

24. Elliott K.A.C., M.P. Benoy, & Z. Baker. "The metabolism of lactic and pyruvic acids in normal and tumor tissues". II Rat kidney and transplantable tumours. Biochem. J. 29:1937. 1935.- ZK 43:Ref. 242. 1936.- AJC 26:622. 1936.

25. Blumenthal F., & P. Meyer. "Ueber durch Acidum lacticum erzeugte Tumoren auf Mohrrübenscheiben. "Ztschr. Krebsforsch. 21:250. 1923/24. - CA 18:2919. 1924.- CAP 35:112. 1924/25.

26. Stahl O., & O. Warburg. "Ueber Milchsäuregärung eines menschlichen Blasencarci carcinoms". Klin. Wchschr. 5:1218. 1926.- CA 20:3314. 1926.

27. Warburg O. "Ueber Milchsäurebildung beim Wachstum". Biochem. Ztschr. 160:307. 1925.- Klin. Wchnschr. 4:12. 1925.- CA 20:1443. 1926.

28. Dermuth F., & R. Meier. "Milchsäurebildung in Gewebekulturen". Biochem. Ztschr. 212:399. 1929.- CR 5:114. 1930.- BA 7:702. 1933.

29. Brisou J. "Action de divers dérivés halogénés sur la fermentation lactique des tissuss animaux normaux et cancéreux, in vivo et in vitro". C.R. Soc. Biol. 112:1391. 1933. - AJC 19:414. 1933.- ZK 40: Ref.92. 1934.- IAC 8:150. 1934.

30. Harmann W. "Ueber die Milchsäurebildung in unbestrahlten und bestrahlten Tumorgewebe". Biochem. Ztschr. 280:173. 1935.- ZK 43: Ref. 178. 1936.- AJC 27: 581. 1936.

31. Parfentjev I. A., W. C. Devrient, & B. Sokoloff. "Influence of lactic acid on transplanted tumors". Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 28 : 538. 1931.- AJC 15: 2838. 1931.- ZK 35: Ref. 165. 1932.

32. Parfentjev I. A., V. D. Suntzeff & B. Sokoloff. "The influence of various preparations of lactic-acid on transplanted tumors" I. Action on sarcoma 39. Amer. J. Cancer 16: 366. 1932.- ZK 33: Ref. 49. 1933.- IAC 7:180. 1933. II Mouse sarcoma 180. Amer. J. Cancer 20:117. 1934.- ZK 41:Ref. 166. 1935.

33. Glaessner K. "Die Milchsäureausscheidung bei Karzinose". Wien. Klin. Wch. schr. 37:358. 1924.- Klin. Wchschr. 4: 1868. 1925.- CA19: 3534. 1925; ibid. 20:236. 1936.- CR 1:164. 1926.